ÉCOTOXINOGÉNÈSE DU *FUSARIUM MONILIFORME*: ENVELOPPE DES RISQUES DES FUMONISINES

Pierrette LE BARS et Joseph LE BARS

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie - I.N.R.A.
B.P. 3 31931 Toulouse

RÉSUMÉ - Soixante souches de *F. moniliforme* furent isolées de 73 échantillons de semence de maïs récoltés [redacted] la main. Ces souches furent ensemencées sur du maïs réhydraté (50 %) et stérilisé, et incubées dans les conditions optimales de production de fumonisine B1 (FB1): 22°C pendant 28 jours . Le dosage hebdomadaire de la FB1 fut effectué par chromatographie planaire instrumentalisée. 95 % des souches produisirent plus de 50 mg FB1/g de maïs; 50 %, produisant plus de 800 mg/g peuvent être considérées comme effectivement dangereuses. Les durées de la demi-vie de la FB1 dans le maïs sont nettement supérieures aux différents traitements thermiques (50 à 150°C). Compte-tenu, d'une part de la fréquence élevée de *F. moniliforme* et de la toxinogénicité des souches, et, d'autre part, de la thermostabilité de la FB1, la contamination du maïs et de [redacted] dérivés constitue un risque réel, confirmé par quelques mycotoxicoses aiguës.

ABSTRACT - Sixty strains of *F. moniliforme* were isolated from 73 samples of corn seeds harvested by hand. These strains were cultivated on hydrated (50 %) and sterilized corn, in optimal condition for fumonisin B1 (FB1) production: 22°C, 28 days. Weekly analysis of FB1 was performed by instrumentalized planar chromatography. 95 % of strains produced more than 50 mg FB1/g corn; 50% producing over 800 mg/g might be considered as actually toxigenic in agronomic situation. Half-life times of FB1 [redacted] corn was definitely longer than different thermal treatments (50 to 150°C). As a consequence , first, of the high frequency of *F. moniliforme* and toxigenesis of strains, and, secondly, of FB1 stability, contamination of corn and its derivatives is a permanent threat, confirmed by occasional acute toxicosis.

MOTS CLÉS - Mycotoxine, *Fusarium moniliforme*, fumonisine B1, toxinogénèse, maïs.

INTRODUCTION

Des cas aigus de leucoencéphalomalacie équine (ELEM) furent associés à la consommation de maïs moisi dès la moitié du 19ème siècle aux USA, puis, plus tard, dans d'autres pays (Marasas *et al.*, 1984). En 1971, cette mycotoxicose fut attribuée au *Fusarium moniliforme* Sheldon (Wilson et Maronpot, 1971). Après de longues années de recherches infructueuses, un nouveau groupe de mycotoxines fut isolé et caractérisé, les fumonisines (Gelderblom *et al.*, 1988; Benzuidenhout *et al.*, 1988). Enfin, le rôle de la fumonisine B1 (FB1) dans l'ELEM fut démontré (Marasas *et al.*, 1988; Laurent *et al.*, 1989). De plus, cette toxine provoque expérimentalement l'oedème du poumon chez le porc (Harrison *et al.*, 1990). Enfin, la FB1 a été impliquée comme l'un des métabolites

du *F. moniliforme* responsable d'effets cancérigènes chez le rat (Gelderblom *et al.*, 1991).

En France, le premier cas d'ELEM fut diagnostiqué sur la base des lésions pathognomoniques et l'examen mycologique (Magnol *et al.*, 1983; Le Bars, 1985). Après quelques intoxications épisodiques mortelles, au cours des deux dernières années, une dizaine de toxicoses fatales furent confirmées par le dosage de la FB1 (Le Bars *et al.*, 1993 et 1994; Dupuy *et al.*, 1993a).

En conséquence, un programme de recherche sur la définition de l'enveloppe des risques de contamination du maïs par la FB1 fut entrepris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions optimales de croissance et de toxinogénèse

Une des souches isolées de maïs ayant provoqué l'une des intoxications évoquées ci-dessus fut ensemencée au centre de boites de Pétri (90 mm) contenant le milieu PDA; les températures d' incubation furent les suivantes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C. La croissance fut estimée quotidiennement par le rayon du thalle. Cette même souche fut cultivée, en erlenmeyer de 100 ml, sur des grains de maïs réhydratés (20 g + 20 ml d'eau) et stérilisés. Au cours de l'incubation, pendant 10 semaines, aux mêmes températures que ci-dessus, un dosage hebdomadaire de la FB1 fut effectué par chromatographie planaire instrumentalisée, comme décrit précédemment (Dupuy *et al.*, 1993).

Origine des souches de *F. moniliforme*

Des échantillons de semence de maïs furent récoltés à la main en fin de maturité et séchés à 35°C pour assurer leur conservation. A partir de 73 lots de différentes variétés et régions, 50 grains furent désinfectés superficiellement et placés sur le milieu PDA. Après incubation à 22°C, 60 souches de *F. moniliforme* furent isolées.

Distribution du pouvoir toxinogène

Chaque souche fut ensemencée sur du maïs, en trois répétitions comme ci-dessus. Après incubation à 22°C pendant 28 jours, le dosage de la FB1 fut effectué. Le même protocole fut mis en oeuvre pour 25 souches "anciennes", isolées au cours des 10 années précédentes et repiquées à plusieurs reprises.

Thermostabilité de la FB1

L'un des paramètres déterminant les niveaux réels de contamination mycotoxique est la stabilité de la toxine dans le substrat cible. Cette étude a été effectuée sur une farine de maïs contaminée par le FB1, après culture d'une souche toxinogène de *F. moniliforme* sur des grains de maïs; 500 mg de farine homogénéisée ont été placés dans des tubes de 20 ml et soumis à 50, 75, 100, 125 et 150°C, dans des bains d'eau ou

d'huile, pendant des durées de 5 à 135 minutes. Chaque traitement et chaque dosage ont fait l'objet de trois répétitions.

RÉSULTATS

A partir des données concernant la croissance et la toxinogénèse, les vitesses maximales pour chaque température furent calculées (figure 1). La température minimale pour la croissance et la toxinogénèse est supérieure à 5°C; les températures maximales sont inférieures ou égales respectivement à 40 et 35°C. La température optimale de toxinogénèse (environ 22°C) est légèrement inférieure à celle de la croissance. En dehors de l'intervalle 15-27°C, la production de FB1 est fortement réduite.

Pour les souches fraîchement isolées, la FB1 fut détectée, au seuil fixé dans cet essai (50 mg/g), dans 95 % d'entre elles; 32 % des souches "anciennes" se révélèrent négatives dans les mêmes conditions (figure 2). La distribution du potentiel toxinogène dans les souches "fraîches" était la suivante: 5 % étaient faiblement toxinogènes (50 - 200 mg/g), 32 % modérèment (200 - 800 mg/g), 39 % fortement (800 - 3200 mg/g) et 18 % très fortement toxinogènes (> 3200 mg/g).

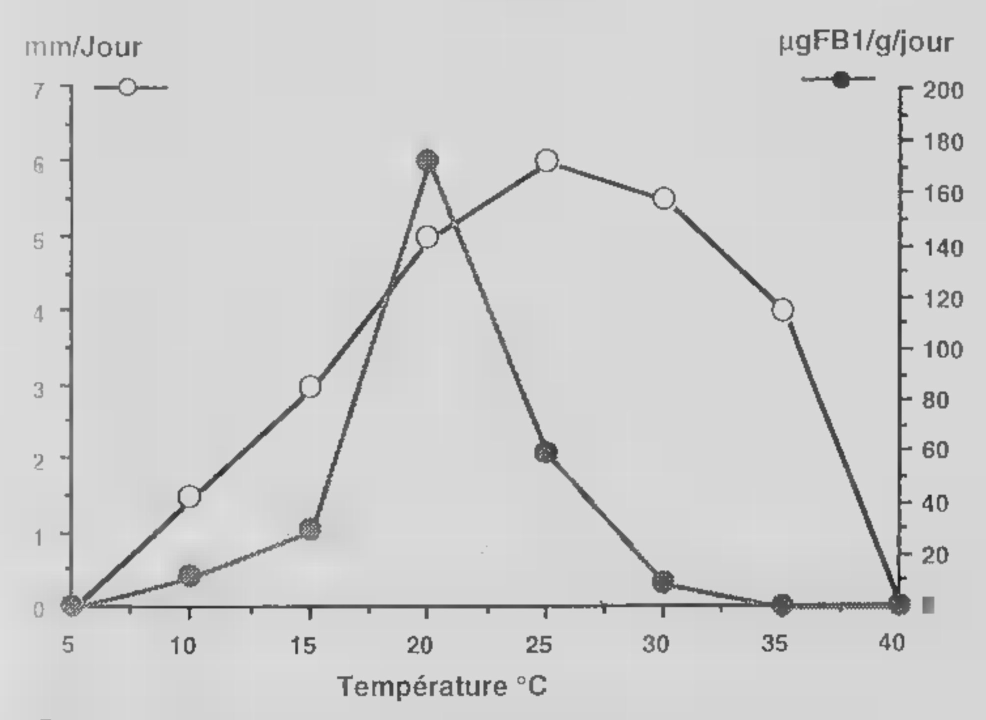


Figure 1 - Vitesse maximale de croissance (mm/jour) et de production de fumonisine B1 (µg FB1/g/jour) en fonction de la température d'incubation.
Figure 1 - Maximal rate for growth (mm/day) and for fumonisin B1 production (µg FB1/g/day) according to incubation temperature.

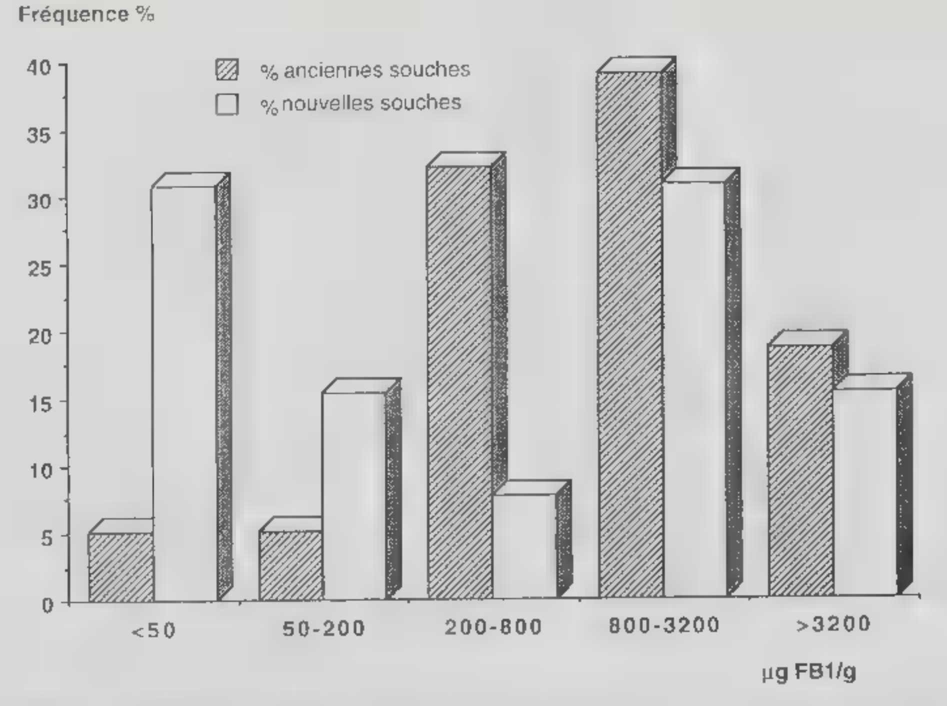


Figure 2 - Distribution du potentiel de production de fumonisine B_1 dans 60 souches de *Fusarium moniliforme* «fraîchement» isolées et dans 25 souches «anciennes».
Figure 2 - Distribution of fumosin B_1 production among 60 «recently» isolated and 25 «old» strains of *Fusarium moniliforme*.

La stabilité de la FB1 dans le broyat de maïs en fonction de la température et de la durée est décrite dans la figure 3; la disparition de la FB1, pour chaque température suit une cinétique de premier ordre: Ln C/Co = -kt, Co étant la concentration initiale et C la concentration pour un traitement donné. Une telle représentation permet de calculer la durée de demi-vie, qui fut de 10, 38, 175 min et 8 h à respectivement 150, 125, 100 et 75°C.

DISCUSSION - CONCLUSION

Le *F. moniliforme* est un contaminant interne fréquent des grains de maïs. La fréquence et la capacité de production de FB1 sont très élevées; en ce qui concerne les souches fraîchement isolées, elles sont généralement supérieures à celles rapportées par ailleurs (Nelson *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1991). Par contre, les souches conservées quelques années sont plus fréquemment peu toxinogènes. Ceci peut résulter d'une perte progressive du pouvoir toxinogène au cours des repiquages successifs, phénomène fréquent en ce qui concerne les métabolites secondaires, en particulier chez les *Fusarium* (Nelson, 1992). Quoiqu'il en soit, plus de 50 % des souches peu-

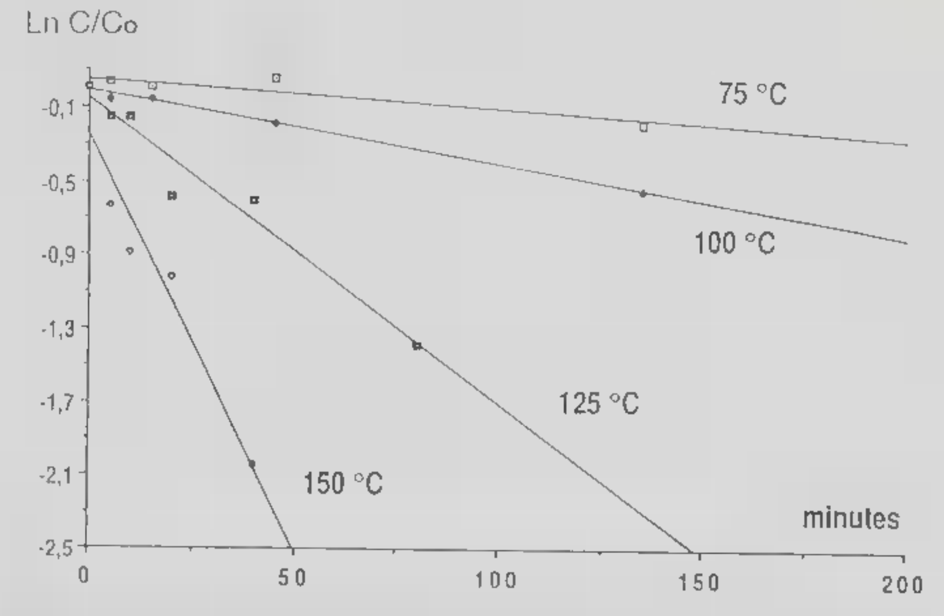


Figure 3 - Etude de la stabilité de la fumonisine B1 dans de la farine de maïs contaminée en fonction de la durée de différents traitements thermiques.
Figure 3 - Stability of fumosin B1 in contaminated powdered corn according to duration of different thermal treatments.

vent être considérées comme potentiellement dangereuses dans les conditions naturelles. La production effective de FB1 dépend en outre de facteurs de l'environnement, principalement disponibilité en eau et en oxygène (Le Bars *et al.*, 1994).

Enfin, la FB1 peut être considérée comme une mycotoxine stable dans le maïs, étant donné que la durée de demi-vie est nettement supérieure à la durée des différents types de traitement thermique (Dupuy *et al.*, 1993b).

En conséquence, parallèlement aux études toxicologiques, il convient d'approfondir ces mécanismes de contamination afin d'en dégager une prévention raisonnée.

RÉFÉRENCES

BENZUIDENHOUT S.C., GELDERBLOM W.C.A., GORST-ALLMAN C.P., HORAK R.M., MARASAS W.F.O., SPITELLER G., VLEGGAR R., 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 743-745.

DUPUY J., LE BARS P., LE BARS J., BOUDRA H., 1993a. Determination of fumonisin B1 in corn by instrumental thin layer chromatography. *J. Planar. Chrom.* 6: 476-480.

DUPUY J., LE BARS P., BOUDRA H., LE BARS J., 1993b. Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2864-2867.

GELDERBLOM W.C.A., JASKIEWICZ K., MARASAS W.F.O., THIEL P.G., HORAK R.M., VLEGGAR R., KRIEK N.P.J., 1988. Fumonisins, novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806-1811.

GELDERBLOM W.C.A., KRIEK N.P.J., MARASAS W.F.O., THIEL P.G., 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliform* ■ metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.

HARRISON L.R., COLVIN B.M., GREENE J.T., NEWMAN L.E., COLE J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, ■ toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 217-221.

LAURENT D., PELLEGRAIN F., KOHLER F., COSTA R., THEVENON J., LAMBERT C., HUERRE M., 1989. La fumonisine B1 dans la pathogénie de la leucoencéphalomalacie équine. *Microbiol. Alim. Nutr.* 7: 285-291.

LE BARS J., 1985. Quelques mycotoxicoses animales mises en évidence récemment en France. *In* C. ROCHE et G. LORGUE, Toxicologie vétérinaire, Collection Méd. légale et Toxicol. Méd., Masson Paris, n°131: 79-86.

LE BARS J., LE BARS P., 1993. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *In* K.A. SCUDAMORE, occurrence and significance of mycotoxins, Central Sc Lab, Slough, UK, 131-137.

LE BARS J., LE BARS P., DUPUY J., BOUDRA H., 1994. Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.* 77: 517-521.

MAGNOL J.P., LE BARS J., QUERE J.P., 1983. Leucoencéphalomalacie toxique chez le cheval. Un cas très probable en territoire métropolitain. *Rev. Méd. Vét.* 134: 297-299.

MARASAS W.F.O., KELLERMAN T.S., GELDERBLOM W.C.A., COETZER J.A.W., THIEL P.G., VAN DER LUET J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B isolated from *Fusarium monoliforme*. *Ondersteport J. Vet. Res.* 55: 197-203.

MARASAS W.F.O., NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., 1984. Toxigenic *fusarium* species: identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa.

NELSON P.E., 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium monoliforme*. *Mycopathologia* 117: 29-36.

NELSON P.E., PLATTNER R.D., SHACKELFORD D.D., DESJARDINS A.E., 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2410-2412.

ROSS P.F., RICH L.G., OSWEILER G.D., NELSON P.E., RICHARD J.L., WILSON T.M., 1992. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* species. *Mycopathologia* 117, 109-114.

THIEL P.G., MARASAS W.F.O., SYDENHAM E.W., SHEPHARD G.S., GELDERBLOM W.C.A., NIEWENHUIS J.J., 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1089-1093.

WILSON B.J., MARONPOT R.R., 1971. Causative agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.* 88: 494-486.